

Thesis

WÜRZBURG

1967

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universität Würzburg**

(Direktor: Professor Dr. med. H. Seeliger)

Kritische Untersuchungen zur Frage einer Kapselbildung bei *Listeria Monocytogenes*

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Jochen Bockemühl
aus Berlin

Würzburg 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H.P.R. Seeliger

KRITISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE EINER KAPSEL-
BILDUNG BEI LISTERIA MONOCYTOGENES

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Jochen Bockemühl

aus Berlin

Würzburg 1967

Referent: Professor Dr. med. H. P. R. Seeliger

Tag der Promotion: 20. 10. 67

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

I. Einleitung	1
II. Die Geschichte der Pflanze	2
III. Die Eigenschaften	11
IV. Die Verwendung	11
V. Die Kultur	12
VI. Die Krankheiten	12

Meiner Mutter in Dankbarkeit



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0127

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Fragestellung	1
II. Material und Methoden	5
III. Ergebnisse	17
IV. Diskussion	30
V. Zusammenfassung	48
VI. Literaturverzeichnis	I-VIII

I. EINLEITUNG

Viele Bakterienarten besitzen außerhalb der Zellwand Hüllsubstanzen, die hinsichtlich ihrer morphologischen und chemischen Beschaffenheit unterschiedlich sind. Die qualitativen und quantitativen Verschiedenheiten dieser Oberflächenstrukturen haben in der Vergangenheit zu Bezeichnungen wie Kapsel, Schleimhülle, Gallerthülle und Außenhülle geführt (TOENNIESSEN 1912, 1914, 1919, 1920; ETINGER-TULCZYNSKA 1933). Heute werden die lichtmikroskopisch nachweisbaren Hüllsubstanzen allgemein in Kapseln und Schleim eingeteilt (DUGUID 1951, WILKINSON 1958, SALTON 1960, 1964).

Als Kapseln werden gelartige, scharf begrenzte Oberflächenstrukturen bezeichnet, die der Zelle fest anhaften und diese als gleichmäßige Schicht umgeben. Sowohl bei lichtmikroskopischer als auch elektronenmikroskopischer Untersuchung erscheinen sie meist als homogene Gebilde. Derartige Strukturen werden z. B. bei Klebsiella pneumoniae, Diplococcus pneumoniae, Bacillus anthracis, Cryptococcus neoformans u. a. gefunden.

Andere Keimarten sind von einer diffusen Schleimschicht umgeben, die der Zellwand im allgemeinen nicht sehr fest anhaftet und sich durch mehrmaliges Waschen meist leicht von der Zelloberfläche löst. Werden solche Keime in Bouillon oder auf halbfesten Nährböden gezüchtet, diffundiert der Schleim in das Nährmedium. Diese Schleimbildung findet man bei einzelnen Stämmen von Streptococcus salivarius, Lactobacillus bifidus und Arten der Gattung Bacillus, z. B. Bacillus subtilis und Bacillus polymyxa.

Stämme mit starker Bekapselung bilden meist gleichzeitig losen Schleim von derselben chemischen Zusammensetzung wie die Kapsel.

Die Fähigkeit zur Bildung extrazellulärer Hüllsubstanzen ist bei bekapselten Stämmen erblich; jedoch ist ihre Ausbildung je nach den Lebensbedingungen der Keime quantitativ wechselnd.

Zahlreiche Beobachtungen weisen darauf hin, daß schleimiges Wachstum von Bakterien durch Phageneinfluß gefördert werden kann. Besonders häufig wurde dies bei Keimen aus der Familie Enterobacteriaceae beobachtet. So berichten KIMURA (1925), KAUFFMANN (1926), DIMTZA (1926) und SONNENSCHN (1932) über die Dissoziation in die sog. Mucosus-Form durch Phageneinwirkung bei E. coli, SONNENSCHN (1926), KASARNOWSKI (1935), NOVGORODSKAJA (1936) und THOMASSEN (1941) bei Salmonella paratyphi B und D' HERELLE (1922) und FELDSTEIN (1942) bei Shigella-Arten. YASUDA (1934) beschrieb den Einfluß von Phagen auf schleimiges Wachstum bei Micrococcus catarrhalis und MAXTED (1952, 1953, 1955) bei Streptococcus pyogenes.

Eine gutausgebildete Kapsel findet man meist bei frisch isolierten Stämmen aus menschlichem oder tierischem Untersuchungsmaterial. Die Tierpassage bietet sich somit als Methode zur Anreicherung von Kapselsubstanzen an, z. B. bei D. pneumoniae, dem Sproßpilz C. neoformans und B. anthracis.

Züchtet man gut bekapselte Stämme längere Zeit im Laboratorium auf einfachen Nährböden, so wird man unter Umständen mit den üblichen Nachweismethoden keine Kapseln mehr feststellen können. Nach Anreicherung dieser Nährböden mit Zuckern oder Serum kann dann bei manchen Stämmen wieder eine verstärkte Kapselbildung herbeigeführt werden.

Zu diesem Zweck hat DUGUID (1951) für Enterobacter aerogenes einen "excess sugar peptone agar" angegeben, der arm an Stickstoff

und Phosphaten ist. Hierdurch wird das Wachstum der Keime begrenzt, und die überschüssigen Kohlenhydrate werden zur Kapselbildung und nicht als Energiequelle verwandt.

SMITH und METZGER (1962) beschrieben einen mit 10 % Serum und 5 % Glucose angereicherten Nährboden auf der Basis von tryptisch abgebautem Sojapepton (serum glucose trypticase soy agar, SGTS-Agar), auf dem die Typstämme 1, 2, 3, 4a und 4b von Listeria monocytogenes nach einigen Passagen als Kapseln deutbare Strukturen ausbildeten. Diese Strukturen waren aber nur elektronenmikroskopisch nachweisbar. Auf Grund histochemischer Befunde der genannten Untersucher sollen sie aus Mucopolysacchariden und sauren Mucopolysacchariden bestehen und die Zelle als kontinuierliche Schicht umgeben.

Bisher waren bei Listerien weder im Lichtmikroskop noch im Elektronenmikroskop Kapseln nachgewiesen worden.

SEELIGER (1955, 1961) beschreibt sie als unbekapselte Bakterien und wird dann durch neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Feinstruktur der Listerien-Zelle bestätigt (EDWARDS und STEVENS 1963, GRUND 1963, 1964).

OSEBOLD und Mitarbeiter (1965) beobachteten, daß die O-Agglutination bei frisch isolierten Stämmen von natürlichen Nager-Infektionen (Typ 4b) in allen Serumverdünnungen nicht stärker als mit + oder ++ Reaktionen anzeigte. Nach Trypsinbehandlung des Antigens steigerte sich die Stärke der Agglutination proportional der Einwirkungsdauer des Trypsins. Hieraus leiteten die Untersucher das Vorhandensein einer dünnen Oberflächenschicht aus Proteinen oder Polypeptiden ab, die die Rezeptoren für die Antikörper überdeckt.

FRAGESTELLUNG

Aus diesen zunächst widersprüchlich erscheinenden Befunden verschiedener Autoren ergibt sich die Notwendigkeit einer Klärung hinsichtlich des Vorkommens von Kapseln oder Hüllsubstanzen bei dieser Bakterienart. Dabei sollte zunächst unter Verwendung der von SMITH und METZGER (1962) beschriebenen Kapselanreicherungsmethode versucht werden, mit lichtmikroskopischen Methoden eventuell vorhandene Kapselstrukturen darzustellen.

Weiterhin war zu untersuchen, ob die von den gleichen Autoren erhobenen Befunde auch serologisch durch spezifische Kapselreaktion und durch unterschiedliches Verhalten verschieden zubereiteter Stammsuspensionen in verschieden hergestellten Immunsereen verifizierbar sind.

Es galt also, über folgende Fragen Aufschlüsse zu erlangen:

1. Bildet L. monocytogenes unter speziellen Kulturbedingungen, so nach Züchtung auf dem von SMITH und METZGER angegebenen Nährmedium, lichtmikroskopisch nachweisbare Kapseln oder andere extrazelluläre Hüllsubstanzen?
2. Erfolgt die Ausbildung solcher Substanzen nach Tierpassage oder vielleicht nur in vivo?
3. Besteht auf Grund serologischer Untersuchungen ein Anhalt für das Vorhandensein von mikroskopisch nicht nachweisbaren Oberflächensubstanzen, die die Zelle als dünne Schicht bedecken?

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Darstellung von Kapsel- und Schleimsubstanzen mit Hilfe

a. getrockneter und fixierter und b. feuchter, unfixierter Präparationen

a. aa.) Zur Verwendung kam die von HOWIE und KIRKPATRICK (1934) beschriebene Reliefdarstellung mit einer wässrigen Eosin-Färbelösung.

Das Färbegemisch setzt sich aus 4 Teilen einer 10 %-igen wässrigen Eosinlösung, 1 Teil bei 56°C inaktiviertem menschlichem oder tierischem Neutralserum und 1 Thymolkristall zusammen. Dieses Gemisch bleibt einige Tage bei Zimmertemperatur stehen, wird dann zentrifugiert und der Überstand aufbewahrt. Diese Färbelösung hält sich bei Zimmertemperatur mehrere Monate.

Die zu untersuchende Kultur wird in einem Tropfen der Lösung suspendiert und eine Minute gefärbt. Anschließend wird analog dem Blutausstrich der Tropfen ausgestrichen und nach dem Trocknen leicht hitzefixiert.

Unter dem Mikroskop sieht man einen homogenen oder feinkörnigen roten Hintergrund, die ungefärbte Kapsel und die rotgefärbte Bakterienzelle. Bilden Mikroorganismen sehr viel Schleim, ist dieser als schlierig-streifige, weiße Aussparung zu erkennen. Stark bekapselte Zellen sind häufig nur sehr schwach oder gar nicht angefärbt, und die einzelnen Keime erscheinen als Aussparungen. Die Zellen grampositiver Bakterien färben sich im allgemeinen dunkler an als die gramnegativer und heben sich besser von dem roten Hintergrund ab. Der Serumzusatz zum Färbegemisch soll bei Untersuchungsmaterial aus flüssigen Kulturen verhindern, daß der Hintergrund zu grobkörnig wird.

bb.) Das Tuschepräparat nach BURRI (1909)

Hierzu wird mit einer Öse die zu untersuchende Kultur in einen Tropfen Tusche eingerieben und anschließend analog dem Blutausschlag ein dünner Tuscheausstrich hergestellt. Nachdem das Präparat luftgetrocknet und hitzefixiert ist, werden die Zellen mit Kristallviolett oder anderen basischen Anilinfarbstoffen durch Gegenfärbung dargestellt. Die Kapsel ist dann als ungefärbter Hof zwischen gefärbter Bakterienzelle und schwarzem Hintergrund zu erkennen.

b. aa.) Reliefdarstellung im wässrigen Milieu nach der erstmalig von PREISZ (1911) und später von DUGUID (1951) beschriebenen "wet film india ink method"

Dazu wird in einem Tropfen Tusche eine Öse der zu untersuchenden Kultur suspendiert. Nachdem der Tropfen mit einem kleinen Deckglas abgedeckt worden ist, wird das Präparat in einem Löschpapierblock leicht gepreßt. Der Tuschefilm sollte dieselbe Dicke wie die untersuchten Keime haben, so daß diese leicht zwischen Objektträger und Deckglas eingeklemmt sind. Ist der Film zu dick, werden die Keime durch die darüberliegenden Tuschepartikel teilweise verdeckt. Ist der Tuschefilm hingegen zu dünn, werden die Mikroorganismen platt gedrückt und deformiert. Das gilt für alle Kapseldarstellungen im feuchten Milieu.

Die Kapsel erscheint als heller gleichmäßiger Hof zwischen der stark lichtbrechenden Zelloberfläche und dem dunklen Tuschehintergrund. Ist gleichzeitig loser Schleim gebildet worden, ist dieser durch seine unregelmäßige Ausbreitung zu erkennen. Außerdem ist loser Schleim häufig von Tuschepartikeln infiltriert oder überlagert und erscheint dadurch dunkler als die Kapsel, die stets frei von Tuscheeinschlüssen ist. Mit dieser Methode können Hüllsubstanzen mit einem Durchmesser über $0,2 \mu$ dargestellt werden.

bb. Protein-Kapsel-Reaktion (PCR) nach TOMCSIK und GUERX-HOLZER (1953)

Hierbei handelt es sich um einen unspezifischen Kapselnachweis im wässrigen Milieu. Innerhalb eines begrenzten p_H -Bereichs kommt

es nach Zugabe von Proteinen oder Proteingemischen, z. B. menschlichem oder tierischem Neutralserum, zu einer salzähnlichen Bindung zwischen der Kapseloberfläche und dem zugegebenen Protein. Infolge der veränderten Lichtdurchlässigkeit wird die Oberfläche der Kapsel im mikroskopischen Nativpräparat als zarte Grenzlinie sichtbar. Gleichzeitig erhöht sich auch die Färbbarkeit der Bakterienzelle und ihrer Oberflächensubstanzen.

Zur Ermittlung des günstigsten p_H -Bereiches wird folgendermaßen vorgegangen:

Man stellt sich eine Verdünnungsreihe her aus Salzsäure - beginnend bei $n/20$ HCl - oder Essigsäure - beginnend bei einer 0,5 %-igen Lösung. Dabei dürfen die Verdünnungsstufen nicht über 50 % liegen. 0,3 ml der verschiedenen Säureverdünnungen werden in je ein Reagenzglas pipettiert; anschließend werden 0,3 ml eines Gemisches zugegeben, das zu gleichen Teilen aus 1:5 bis 1:20 verdünntem Rinderserum und einer Bakteriensuspension besteht, die in etwa auf eine Dichte von $1,2 \times 10^9$ Keimen pro ml eingestellt ist.

Innerhalb einer Stunde wird aus jedem Reagenzglas 1 Tropfen auf einen Objektträger gebracht und mit einer kleinen Öse Methylenblaulösung gemischt. Das Präparat wird mit einem Deckglas abgedeckt und in einem Löschpapierblock leicht gepreßt.

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung erkennt man im optimalen p_H -Bereich die zum größten Teil blau gefärbten Zellen, deren Kapseloberfläche als zarte Kontur in Erscheinung tritt.

cc.) Die Spezifische Kapselreaktion nach NEUFELD (1902)

Hierzu muß von dem zu prüfenden bekapselten Stamm ein Antiserum hergestellt werden.

Auf einem Objektträger wird ein kleiner Tropfen des spezifischen Antiserums mit einer Öse der Bakterienkultur gemischt und fünf Minuten in der feuchten Kammer bebrütet. Danach werden die Keime mit etwas Methylenblau-Lösung angefärbt und mit einem Deckglas abgedeckt. Unter dem Mikroskop ist die Kapseloberfläche als zarte Linie zu erkennen.

Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Präzipitation an der Kapseloberfläche, wodurch diese sichtbar wird, aber nicht - wie früher angenommen wurde (NEUFELD 1902, ETINGER-TULCZINSKA 1933) - um eine gleichzeitige Quellung.

c. In Vorversuchen wurden die unspezifischen Kapseldarstellungsmethoden nach HOWIE-KIRKPATRICK, BURRI, PREISZ-DUGUID und TOMCSIK-GUEX-HOLZER an folgenden bekapselten Mikroorganismen auf ihre Empfindlichkeit untersucht:

Tabelle 1:

	Art	isoliert aus
a. gramnegative Bakterien mit Kapselbildung	<u>K. pneumoniae</u> <u>E. coli</u> <u>B. anitratum</u> Keim der <u>Alkal-</u> <u>cens-Dispar-Gruppe</u>	Katheterurin Säuglingsstuhl Katheterurin Rachenabstrich (postpneumonischer Zustand)
b. grampositive Bakterien mit Kapselbildung	<u>D. pneumoniae</u>	Rachenabstrich
c. grampositive Sporenbildner mit Kapselbildung	<u>B. anthracis</u>	Stammsammlung des Hyg.Inst. Würzburg Nr. HW 448
d. Sproßpilze mit Kapselbildung	<u>C. neoformans</u>	Stammsammlung des Hyg.Inst. Würzburg Nr. M 5271/61
e. Bildung von losem Schleim ohne Kapsel	<u>S. paratyphi B,</u> muköse Form <u>B. polymyxa</u>	Stammsammlung des Hyg.Inst. Würzburg Nr. B 5a Stammsammlung des Hyg.Inst. Würzburg Nr. HW 431

Die Kapselanreicherung bei Klebsiella pneumoniae erfolgte auf dem "excess sugar peptone agar" nach DUGUID (1951).

Dieses Nährmedium hat folgende Zusammensetzung:

Maltose	5,0
Bactopepton	0,5
Na ₂ HPO ₄	3 Teile
KH ₂ HPO ₄	1 Teil 5,0-10,0
NaCl	2,0
K ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄	0,1
CaCl ₂	0,01
FeSO ₄	0,001
Agar	20,0
Aqua dest.	1000,0

Die Keime wurden auf diesem Nährboden 14 Tage bei Zimmer-temperatur gezüchtet.

Die Kapselanreicherung bei Diplococcus pneumoniae erfolgte durch Mäusepassage.

2 weiße Mäuse wurden mit je $1,2 \times 10^9$ Keimen i. p. infiziert. Die Tiere starben nach 24 Stunden und die Keime wurden aus dem Peritonealexsudat isoliert und nach nochmaliger Überimpfung auf Blutagar untersucht.

Bacillus anthracis wurde ebenfalls zur Züchtung von Kapseln auf Mäuse überimpft.

Eine ca. 2 mm große Einzelkolonie wurde in 5 ml physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und anschließend je 0,5 ml dieser Suspension 4 weißen Mäusen i. p. injiziert. Die Tiere starben nach 24 Stunden.

Da diese Art ihre Kapseln im allgemeinen nur im lebenden Organismus ausbildet, wurden die Kapseluntersuchungen im Peritonealexsudat der Versuchstiere durchgeführt, welches mit physiologischer

NaCl-Lösung verdünnt war. Die Schwierigkeit lag bei dieser Untersuchungsmethode darin, eine möglichst reine Bakteriensuspension zu erhalten, da größere Beimengungen von Körperzellen und viskösem Exsudat die Beurteilung erschweren.

Bei den übrigen in Tabelle 1 aufgeführten Keimen war eine Kapselanreicherung nicht erforderlich.

Für Cryptococcus neoformans stand zur Durchführung einer spezifischen Kapselreaktion ein polyvalentes Cryptococcus-Antiserum des Hygiene-Institutes Würzburg zur Verfügung.

2. Für die Untersuchungen wurden die 5 Typstämme von Listeria monocytogenes (vgl. PATERSON 1940, SEELIGER 1958 a, 1961) herangezogen, die der Stammsammlung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg, Listeria-Zentrale, entnommen wurden.

Typ 1 - Stamm Nr. 7973

Typ 2 - Stamm Nr. 5348

Typ 3 - Stamm Nr. 5105

Typ 4a - Stamm Nr. 5214

Typ 4b - Stamm Nr. 1071/53

Die Tierpathogenität dieser Stämme wurde an 15g - 20 g schweren weißen Mäusen geprüft. Die Tiere wurden mit steigenden Dosen, beginnend bei 30 Millionen Keimen i.p. infiziert.

Zur Anreicherung möglicher kapselähnlicher Oberflächensubstanzen wurden die Stämme Nr. 7973 und Nr. 1071/53 über 5 Passagen auf 20g schweren weißen Mäusen gezüchtet. Die Keime wurden nach jeder Passage aus der Leber oder dem Peritonealexsudat isoliert, auf Reinheit überprüft und nach biochemischer und serologischer Differenzierung erneut überimpft. Jede Subkultur wurde mittels der Kapselnachweismethoden nach HOWIE-KIRKPATRICK, BURRI,

PREISZ-DUGUID und NEUFELD auf die Bildung kapselähnlicher Substanzen untersucht. Nach der 5. Passage wurde zusätzlich die Methode nach TOMCSIK-GUEX-HOLZER angewandt.

3. Die 5 Typstämme von L. monocytogenes wurden nach der von SMITH und METZGER (1962) beschriebenen Methode zur Anreicherung von Kapselsubstanzen auf Serum-Glucose-Trypticase-Soy-Agar (SGTS-Agar) gezüchtet.

Dieser Nährboden wird folgendermaßen hergestellt:

Trypticase Soy Agar (BBL)	40,0
Glucose	50,0
Aqua dest.	ad 1000,0

Nach vorsichtigem Erhitzen bis zur Lösung der Substanzen wird der Nährboden bei 0,5 atü autoklaviert und kurz vor dem Erstarren 100 ml neutrales Kaninchenserum zugegeben.

Die zur Antigenbereitung verwendete Serum-Glucose-Trypticase-Soy-Broth (SGTSB) hat dieselbe Zusammensetzung ohne Agar.

Die 5 Typstämme wurden 20 Tage lang täglich überimpft und bei 37°C bebrütet. Zur Kontrolle wurde von jeder Passage eine Kultur auf Blutagar angelegt. Das biochemische Verhalten wurde bis zur 10. Passage alle 2 Tage, weiterhin nach der 14., 17. und 20. Passage in der "Bunten Reihe" überprüft; gleichzeitig wurden auch die serologischen Eigenschaften kontrolliert.

Von der 1. bis 10. sowie der 20. Passage wurden je ein Eosinausstrich nach HOWIE-KIRKPATRICK, ein fixiertes Tuschepräparat mit Kristallviolettgegenfärbung sowie ein feuchtes Tuschepräparat angefertigt und auf eventuelle Bildung von extrazellulären Hüllsubstanzen untersucht. Die Kapselnachweismethode nach TOMCSIK-GUEX-HOLZER wurde bei der Ausgangspassage, der 10. und der 20. Passage angewandt. Da bei vielen Keimen eine deutliche Kapsel- und Schleimbildung in der Kultur erst nach längerem Wachstum bei Zimmertemperatur auftritt (DUGUID 1951), wurde die 10. Passage der 5 Typstämme 14 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen

und anschließend mittels Grampräparat und der genannten 4 Kapseldarstellungsmethoden untersucht.

4. Zur Herstellung von O-Antigenen der 5 Typstämme von L. monocytogenes wurden verschiedene Verfahren angewandt.

a. Bereitung von O-Antigenen nach SEELIGER (1955, 1961):

Von einer 24 Std. alten Kultur in Tryptosebouillon wurden die Keime auf 1 %-igen Dextrose-Tryptose-Agar überimpft und 24 Std. bei 37°C bebrütet. Das Wachstum wurde dann in phosphatgepufferter physiologischer NaCl-Lösung (p_H 7,2) aufgenommen und 1 Std. auf 100°C erhitzt, um die Keime abzutöten und die H-Antigene zu zerstören. Anschließend wurden die Antigene dreimal in phosphatgepufferter physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und zur Ausschaltung der Neigung zur Spontanagglutination 10 Minuten bei einer Leistung von 3W/cm² beschallt. Auf diese Weise werden die Antigene suspensionsstabil, ohne daß es bei der kurzen Beschallungsdauer zu einer Zerstörung der Zellen kommt. Da die Antigenbereitungen trotz Suspension in gepufferter NaCl-Lösung häufig sauer reagieren und die Neigung zur Spontanagglutination mit zunehmender Säuerung steigt, wurde der p_H -Wert anschließend nochmals kontrolliert und auf p_H 7,2 eingestellt.

b. Um die Zerstörung eventuell vorhandener thermolabiler Hüllsubstanzen zu verhindern, wurden weiterhin Kulturen der 5 Typstämme auf 1 %-igem Dextrose-Tryptose-Agar nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C in 0,3 %-iger Formol-NaCl-Lösung aufgenommen.

Nachdem sich die Keime im Laufe einer Woche weitgehend abgesetzt hatten, wurde der Überstand durch vorsichtiges Pipettieren entfernt und der Bodensatz in phosphatgepufferter NaCl-Lösung mit 0,3 % Formalin suspendiert. Anschließend wurde das p_H auf 7,2 eingestellt.

Bei dieser Methode wurden zwar die H-Antigene nicht zerstört, doch war eine starke Ausbildung der Geißeln auf diesem relativ festen Nährboden (Agargehalt 1,5 %) bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C nicht zu erwarten.

c. Bereitung eines "capsule enhanced antigen" nach SMITH und METZGER (1962):

Die 5 Typstämme von *L. monocytogenes* wurden nach der 10. Passage von Serum-Glucose-Trypticase-Soy-Agar (SGTS-Agar) auf Serum-Glucose-Trypticase-Soy-Broth (SGTSB) überimpft. Pro Stamm wurden 4 Kolben zu 275 ml SGTSB beimpft und 18 Stunden bei 37°C bebrütet. Die anfangs klare Bouillon zeigte nach dieser Inkubation eine gleichmäßig weiße Trübung. Die Kultur wurde dann 20 Min. bei 2000 U/Min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dabei war besonders darauf zu achten, daß keine Bouillonreste zurückblieben, da diese Nährbodenreste eine Spontanagglutination des Antigens bewirken können. Das Sediment eines jeden Kolbens wurde anschließend in 30 ml phosphatgepufferter NaCl, pH 7,2, suspendiert und 1 Stunde auf 100°C im strömenden Dampf erhitzt.

d. Bereitung von trypsinisiertem 0-Antigen nach OSEBOLD, AALUND und CHRISP (1965):

Die 5 Typstämme wurden 24 Std. bei 37°C in Tryptose-Bouillon gezüchtet und dann auf Tryptose-Agar überimpft. Nach einer 48-stündigen Bebrütung bei 37°C wurden die Kulturen mit 0,85 %-iger NaCl-Lösung abgeschwemmt und 1 Stunde auf 100°C im strömenden Dampf erhitzt. Die Suspension wurde sodann zweimal in Phosphatpuffer nach WHEELER, LUHBY und SCHOLL (1950) gewaschen. Dieser kochsalzfreie Phosphatpuffer besteht aus einem Gemisch von 766 ml m/15 Na₂HPO₄-Lösung und 233 ml m/15 KH₂PO₄-Lösung. Die Antigene wurden im Photometer (EPPENDORF) auf eine Dichte von 50 - 53 % optischer Transmission bei einer Wellenlänge von 436 nm eingestellt und anschließend 20-fach konzentriert. Zu 9 Teilen konzentrierter Zellsuspension wurde 1 Teil Trypsin-Lösung in einer Konzentration von 0,5 mg/ml zugegeben und das Gemisch 30 Minuten bei 37°C gehalten. Zur Herstellung der Trypsin-Lösung stand kristallisiertes Trypsin (MERCK) zur Verfügung. Das trypsinisierte Antigen wurde zweimal in phosphatgepufferter NaCl-Lösung, pH 7,2, gewaschen und anschließend mit Formalin-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,25 % versetzt.

5. Von jedem Stamm wurden 2 verschiedene 0-Antisera hergestellt.

a. 0-Antigen nach SEELIGER - mit Kulturen von Tryptose-Agar - wurde in steigender Menge im Abstand von 3 bis 4 Tagen je einem Kaninchen i.v. injiziert, bis ein Titer von mindestens 1:2000 er-

reicht war. Bei den Stämmen Nr. 7973, Nr. 5348 und Nr. 5214 genügten 7 Injektionen mit folgenden Mengen (Antigen eingestellt auf $2,1 \times 10^9$ Keime je ml nach MC FARLAND):

1 ml - 2 ml - 3 ml - 4 ml - 5 ml - 5 ml - 5 ml.

Bei den Stämmen Nr. 5105 und Nr. 1071/53 mußte die Immunisierung noch länger fortgeführt werden, da die Antikörperbildung nicht ausreichte. Das Blut wurde durch Herzpunktion der Kaninchen gewonnen. Die Seren wurden ohne Zusatz eines Desinfektionsmittels in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt.

b. 0-Antigen der 5 Typstämme, hergestellt nach SMITH und METZGER, wurde in 3 bis 4-tägigen Abständen je 2 Kaninchen i.v. injiziert. 6 Injektionen dieser ziemlich dichten Zellsuspensionen mit mindestens 3×10^9 Keimen je ml in folgenden Mengen: 0,5 ml - 1,0 ml - 1,0 ml - 1,5 ml - 2,0 ml - 2,0 ml ergaben bei den Stämmen Nr. 5348, Nr. 5105, Nr. 5214, Nr. 1071/53 Titer von mindestens 1 : 3200. 0-Antigen des Stammes Nr. 7973 mußte noch dreimal nachgespritzt werden, da der Titer zu niedrig war.

Alle Seren wurden durch Entbluten der Tiere gewonnen und ohne Konservierungszusatz in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt.

c. 0-Faktorenseren zur Typisierung der Stämme wurden durch Absättigung der 0-Vollseren mit 0-Antigenen hergestellt. Folgende 0-Faktorenseren wurden auf diese Weise gewonnen (vgl. DONKER-VOET 1957, SEELIGER 1955, 1958a, 1961)

I; I, II; IV; V, VI; VI; VII; VIII; IX.

Zur Herstellung der Faktorenseren VI bis IX war die Herstellung von 0-Antiseren der Listeria-Typen 4c, 4d und 4e (DONKER-VOET) erforderlich. Diese Stämme wurden ebenfalls der Kulturensammlung der Würzburger Listeria-Zentrale entnommen.

Für die Differenzierung der Listeria-H-Antigene standen H-Faktorenseren der Würzburger Listeria-Zentrale zur Verfügung.

6. a. Die 0-Antigene der 5 Typstämme von L.monocytogenes, bereitet nach SEELIGER, SMITH und METZGER, OSEBOLD und in 0,3 %-iger Formol-NaCl-Lösung, wurden im WIDAL'schen Versuch in den beiden nach SEELIGER und nach SMITH und METZGER gewonnenen homologen Immunseren agglutiniert. Dabei sollte untersucht werden, ob die verschieden bereiteten Antigene des gleichen Typs in den homologen Immunseren mit unterschiedlicher Titerhöhe agglutiniert werden.

Weiterhin war zu prüfen, ob vielleicht ein unterschiedlicher Agglutinationstyp Hinweise auf das Vorhandensein von Hüllsubstanzen gibt (STUART, FEINBERG und FEINBERG 1948).

Die Antigene wurden mit dem Photometer (EPPENDORF) auf eine Dichte von 28 % optischer Transmission bei 436 nm eingestellt. Zu 0,25 ml Serum (geometrische Verdünnungsreihe, beginnend bei einer Verdünnung von 1:4) wurde die gleiche Menge an Antigen zugegeben. Nach 2-stündiger Bebrütung bei 50°C im Wasserbad und 18 Std. bei Zimmertemperatur wurde das Ergebnis mit dem Agglutinoskop abgelesen.

b. Bei allen Verdünnungsreihen wurden sodann die Agglutinate der Verdünnungsstufe 1:64 auf einem Objektträger mit einem kleinen Tropfen Methylenblau angefärbt und mikroskopisch untersucht, ob eine eventuell vorhandene Kapsel durch eine spezifische Kapselreaktion sichtbar geworden war. Die Verdünnungsstufe 1:64 wurde deshalb gewählt, weil bei allen Agglutinationsreihen die Agglutination in dieser Verdünnung sehr deutlich ausgefallen war.

Darüberhinaus wurden nochmals die 5 Typstämme auf SGTS-Agar gezüchtet und nach der 5. Passage die spezifische Kapselreaktion mit "Kapsel-Antiserum" nach SMITH und METZGER und lebendem Antigen durchgeführt.

c. Um festzustellen, ob in dem durch Immunisierung mit "capsule enhanced antigen" nach SMITH und METZGER gewonnenen Anti-

serum möglicherweise Kapselfaktoren vorhanden sind, wurden diese Antigene mit den typgleichen Antigenen nach SEELIGER und OSEBOLD abgesättigt.

Unter dem Mikroskop wurde untersucht, ob diese beiden "Kapselfaktorensereen" folgende typgleichen Antigene agglutinierten:

Antigen nach SMITH und METZGER

Antigen nach SEELIGER

Antigen nach OSEBOLD

frisch hergestellte Stammsuspension von SGTS-Agar,
12. bzw. 14. Passage.

Um die Zellen und eine mögliche Kapselreaktion besser beurteilen zu können, wurden die Präparate nach einer Bebrütung von 5 Minuten in der feuchten Kammer unmittelbar vor der mikroskopischen Untersuchung vom Deckglasrand her mit Methylenblau angefärbt.

III. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse zur Sicherung der angewandten Methoden

Die Zuverlässigkeit der Kapseldarstellungsmethoden nach HOWIE-KIRKPATRICK, BURRI, PREISZ-DUGUID und TOMCSIK-GUEX-HOLZER wurde bei den in Tabelle 1 aufgeführten bekapselten und schleimbildenden Mikroorganismen nachgewiesen.

Die Anwendung des Verfahrens von TOMCSIK-GUEX-HOLZER mittels 1:5 verdünntem neutralen Rinderserum ergab bei den untersuchten Keimarten positive Kapselreaktionen bei folgenden HCl-Verdünnungen (HCl-Konzentrationen bezogen auf das Gesamtvolumen von Serum + Keimsuspension + Säure):

Tabelle 2:

	n/40	n/60	n/80	n/120	n/160	n/240	n/320	n/480	n/640
<u>K. pneumoniae</u>	-	-	+	++	+++	++	(+)	-	-
<u>E. coli</u>	-	-	-	(+)	++	+	-	-	-
<u>B. anitratum</u>	-	-	-	-	+	++	-	-	-
<u>Alkalescens- Dispar</u>	-	(+)	++	++	+++	(+)	-	-	-
<u>D. pneumoniae</u>	-	-	-	-	++	+++	(+)	-	-
<u>B. anthracis</u>	-	-	-	-	(+)	+	++	-	-
<u>C. neoformans</u>	-	-	(+)	++	++	-	-	-	-

Daraus konnte gefolgert werden, daß die Methoden einwandfrei anzeigten und die zur Beantwortung der Fragen nötige Spezifität und Empfindlichkeit aufwiesen.

2. Tierpathogenität der Versuchstämme

Die Prüfung der Tierpathogenität der Listeria-Typstämme ergab eine unterschiedliche Virulenz der einzelnen Stämme:

Tabelle 3:

Typ und Stamm-Nr.	Zahl der injizierten Keime in Millionen							Zahl der infizierten Mäuse
	30	60	90	120	180	300 600 900	1200 1500 1800	
Typ 1 7973	+	+	+					3
	4. Tag	4. Tag	6. Tag					
Typ 2 5348	+	+	+					3
	3. Tag	4. Tag	3. Tag					
Typ 3 5105	-	- -	-	-	-	- - -	- - -	12
Typ 4a 5214	-	- -	+	+	+			6
			3. Tag	4. Tag	2. Tag			
Typ 4b 1071/53	+	+	+					3
	3. Tag	3. Tag	4. Tag					

Die Keime wurden nach dem Tod der Mäuse aus der Leber oder dem Peritonealexsudat wieder in Reinkultur gezüchtet und biochemisch und serologisch identifiziert.

Der seit 1931 auf künstlichen Nährböden weitergezüchtete Stamm Nr. 5105 erwies sich selbst bei höchsten Infektionsdosen als avirulent gegenüber der weißen Maus.

3. Verhalten der Stämme nach Tierpassagen

Die 5 Tierpassagen der Stämme Nr. 7973 und Nr. 1071/53 zeigten gleiche Ergebnisse. Die Mäuse starben nach einer i. p. -Infektion mit 3×10^7 Zellen am 3. bis 4. Tag. Die Keime ließen sich leicht aus der Leber und dem Peritonealexsudat rekultivieren. Auf Blutagar wuchsen sie mit typischen glatten Kolonien und deutlicher β -Haemolyse; sie unterschieden sich nicht vom Zustand der Ausgangspassage. Schleimiges Wachstum fehlte stets.

Auch die mikroskopische Untersuchung auf eine Kapsel- oder Schleimbildung mittels verschiedener Nachweismethoden ließ während der 5 Passagen keinen Unterschied zur Ausgangskultur erkennen.

Im Peritonealexsudat wurden weder mit dem feuchten Tuschepräparat noch mit der spezifischen Kapselreaktion Kapselstrukturen nachgewiesen.

4. Verhalten der Stämme nach Passage auf SGTS-Agar

Bei Züchtung der Stämme auf SGTS-Agar war während der 20 Passagen eine Änderung der Größe, des Aussehens und der Form der Kolonien nicht festzustellen. Auch bei mikroskopischer Untersuchung änderten sich während der 20 Passagen weder die Form und die Färbbarkeit der Keime noch ergab sich irgend ein anderer Hinweis auf die Bildung von Kapsel- und Schleimsubstanzen. Nach 14-tägigem Wachstum auf SGTS-Agar bei Zimmertemperatur waren kein schleimiges Wachstum oder eine Veränderung des Koloniebildes festzustellen.

Die Farbe der Kolonien nach 24-stündiger Bebrütung war auf Blutagar milchig weiß, auf SGTS-Agar mehr glasig-trüb. Die Trans-

parenz der Kolonien nahm mit zunehmendem Alter ab; dabei nahmen die Kolonien auf Blutagar eine rein weiße, auf SGTS-Agar etwa nach drei Tagen eine grauweiße bis gelbweiße Farbe an.

Die einzelnen Stämme waren jedoch in Einzelheiten makroskopisch und mikroskopisch verschieden. Diese charakteristischen Eigenschaften seien im Folgenden näher beschrieben:

Typ 1, Stamm Nr. 7973, wuchs auf Blutagar und SGTS-Agar nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C mit glatten Kolonien von 0,5 bis 1 mm Durchmesser. Die β -Haemolyse war auf Schafblutagar deutlich sichtbar. Im Grampräparat waren grampositive Stäbchen vorherrschend.

Nach 14-tägigem Wachstum auf SGTS-Agar bei Zimmertemperatur hatten die größten Einzelkolonien einen Durchmesser von 2 mm, im Grampräparat waren degeneriert wirkende, lange, schlanke, gramlabile Stäbchen in Kettenlagerung zu erkennen.

Typ 2, Stamm Nr. 5348, zeigte auf Schafblutagar eine stark ausgeprägte β -Haemolyse. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C hatten die Einzelkolonien auf Blutagar und SGTS-Agar einen Durchmesser von knapp 1 mm. Im Grampräparat waren überwiegend kurze plumpe, grampositive Stäbchen erkennbar.

Nach 14-tägigem Wachstum auf SGTS-Agar bei Zimmertemperatur erreichten Einzelkolonien einen Durchmesser von 2 bis 3 mm; im Grampräparat waren kräftige plumpe, grampositive Stäbchen zu erkennen.

Typ 3, Stamm Nr. 5105, wuchs sehr zart und erreichte nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C auf SGTS-Agar Einzelkolonien von etwa 0,5 mm, auf Blutagar von höchstens 1 mm. Die β -Haemolyse war nur sehr schwach ausgeprägt. Im Grampräparat waren

die schlanken, grampositiven Stäbchen in Ketten unterschiedlicher Länge gelagert und machten den Eindruck eines in die Rauhform übergehenden Stammes. Dieser Eindruck wurde verstärkt durch die fehlende Virulenz gegenüber der weißen Maus. Dabei ist jedoch zu bemerken, daß die Kolonien auch noch nach 14-tägigem Wachstum auf SGTS-Agar eindeutig glatt aussahen. Sie erreichten jedoch nur einen Durchmesser von 1 mm und wirkten etwas stärker grauweiß gefärbt als die der übrigen Stämme. Diese Zwergform der Koloniebildung wurde bisher m.W. nicht beschrieben.

Im Grampräparat war nach dieser Zeit nur noch ein Geflecht langer brüchiger, in Ketten gelagerter Keime zu erkennen. Dabei war es teilweise schwer, die einzelnen Zellen abzugrenzen.

Typ 4a, Stamm Nr. 5214, bildete auf SGTS-Agar und Blutagar bereits nach 24 Stunden flache Kolonien von 1 bis 1,5 mm Durchmesser, die nach längerem Wachstum besonders auf SGTS-Agar deutlich als Kulturvariante der S-Form - sog. I-Form (SEELIGER 1958a) - in Erscheinung traten. Auf Schafblutagar war die β -Haemolyse deutlich ausgeprägt. Im Grampräparat waren überwiegend kräftige, ziemlich große grampositive Stäbchen zu erkennen.

Nach 14-tägigem Wachstum auf SGTS-Agar erreichten Einzelkolonien einen Durchmesser von 2 bis 2,5 mm und ließen im Grampräparat lange, plumpe Stäbchen erkennen, die in kürzeren und längeren Ketten gelagert waren.

Da die Kulturvariante der S-Form als Übergang der S-Form in die R-Form angesehen werden dürfte (SEELIGER 1958a), wäre damit auch die abgeschwächte Virulenz dieses Stammes gegenüber der weißen Maus erklärt.

Typ 4b, Stamm Nr. 1071/53, war gekennzeichnet durch kokkoide und kurze, plumpe grampositive Stäbchen. Er erreichte auf Blut-

agar nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C Einzelkolonien von 1 mm Durchmesser; auf SGTS-Agar dagegen wuchs er zarter und bildete Einzelkolonien von durchschnittlich 0,5 mm. Die β -Haemolyse war auf Schafblutagar sehr stark ausgeprägt.

Nach 14-tägigem Wachstum auf SGTS-Agar bei Zimmertemperatur hatten Einzelkolonien einen Durchmesser von 1 bis 2 mm. Im Grampräparat waren dann überwiegend grampositive und gramlabile, kräftige Stäbchen, die in sehr kurzen Ketten gelagert waren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die 5 Typstämme von L. monocytogenes auf SGTS-Agar keineswegs kräftiger und schleimiger wuchsen als auf Blutagar, im Gegenteil, bei den Stämmen Nr. 5105 und Nr. 1071/53 wurden auf Blutagar konstant während der 20 Passagen größere Kolonien erzielt als auf SGTS-Agar.

Nach 14-tägigem Wachstum bei Zimmertemperatur waren die Kulturen auf SGTS-Agar eindeutig schwächer entwickelt als auf Blutagar. Hierbei dürfte die Säuerung des Nährbodens infolge Glucoseabbaues eine wesentliche Rolle spielen.

5. Verhalten der Antigene im Agglutinationsversuch

Die Agglutination der 0-Antigene nach SEELIGER, SMITH und METZGER, OSEBOLD und in 0,3 %-iger Formol-NaCl-Lösung in den homologen Antiseren - bereitet nach SEELIGER und nach SMITH und METZGER - ergab keine wesentlich voneinander abweichenden Serumtiter. Ebenso war der Agglutinationstyp in allen Reaktionen als echter 0-Agglutinationstyp zu bezeichnen. Gewisse Unterschiede bestanden allerdings hinsichtlich der Agglutinationsstärke und der Form der einzelnen Agglutinate:

Die Antigene nach SEELIGER und nach SMITH und METZGER ergaben im Vergleich zu den beiden anderen Antigenen meist härtere,

feinkörnigere und relativ kleinere Agglutinate, die das Aussehen flacher, gepreßter Plättchen haben und gegen Aufschütteln ziemlich unempfindlich waren.

Das Antigen nach OSEBOLD und Mitarbeitern bewirkte grobfetzigere und lockerere Agglutinate, die an Schneeflocken erinnern und sich leichter zerschütteln ließen. Dabei führte aber auch stärkeres Aufschütteln nicht zu einer völligen Zerstörung der Agglutinate. Der Übergang von einer deutlich positiven Reaktion zur negativen verlief häufig gut erkennbar nur über 1 bis 2 Verdünnungsstufen.

Das in 0,3 %-iger Formol-NaCl-Lösung suspendierte Antigen führte teilweise zu Agglutinen, die denen des OSEBOLD-Antigens sehr ähnlich waren. Die Ausbildung größerer Agglutinate war aber unterschiedlich und nicht so regelmäßig. Außerdem ließen sich die Agglutinate aus diesem Antigen weitgehend zerschütteln. Ein wesentlicher Nachteil war, daß dieses Antigen immer zur Spontanagglutination neigte. Damit ist wohl auch teilweise das Auftreten kräftiger Agglutinate zu erklären. Außerdem ließ sich der Grenztiter schwerer ermitteln.

Während die Antigene nach SEELIGER, OSEBOLD und in 0,3 %-iger Formol-NaCl-Lösung frisch zubereitet waren, lagerten die Antigen-suspensionen nach SMITH und METZGER bereits 2 Monate im Kühlschrank bei 4°C.

Die Agglutinationsergebnisse sind in den Tabellen 4 bis 8 wiedergegeben. Wie daraus ersichtlich ist, trat bei einigen Agglutinationsreihen ein deutliches Prozononphänomen auf.

6. Ergebnisse der serologischen Kapselreaktion

Die mikroskopische Untersuchung der mit Methylenblau angefärbten Agglutinate der Verdünnungsstufe 1:64 ergab keinen Hinweis auf eine Kapselreaktion. Auch die spezifische Kapselreaktion mit 1:2 verdünntem Antiserum nach SMITH und METZGER und lebendem Antigen von der 5. Passage auf SGTS-Agar verlief stets negativ.

7. Ergebnisse der Absättigungsversuche

Die von jedem Stamm nach Absättigung der "Kapselantisera" nach SMITH und METZGER mit den typgleichen O-Antigenen nach SEELIGER und OSEBOLD gewonnenen zwei "Kapselfaktorseren" ergaben weder eine mikroskopisch sichtbare Kapselreaktion noch eine Agglutination mit den Antigenen nach SEELIGER, OSEBOLD, SMITH und METZGER und einer frisch bereiteten Zellsuspension mit lebenden Keimen von SGTS-Agar.

Tabelle 4 L. monocytogenes Stamm Nr. 7973

Antiserum nach SEELIGER															
Antigen nach	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	Negativkontrolle	
SEELIGER	-	-	(+)	(+)	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-	
SMITH u. METZGER	(+)	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	-	-	-	-	
OSEBOLD	(+)	(+)	(+)	+	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	
0,3 % Formol-NaCl	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)	-	-	schwach spontan-agglutininabel	

Antiserum nach SMITH u. METZGER

Antigen nach		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	Negativkontrolle
SEELIGER		-	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-
SMITH u. METZGER		+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-
OSEBOLD		(+)	+	+	++	++	++	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-
0,3 % Formol-NaCl		(+)	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	schwach spontan-agglutininabel

Serumverdünnungen ab 1:500 abgerundet

Tabelle 5 L. monocytogenes Stamm Nr. 5348

Antiserum nach SEELIGER															
Antigen nach	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	Negativkontrolle	
SEELIGER	++	++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SMITH u. METZGER	++	++	+++	+++	++	++	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-
OSEBOLD	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-
0, 3 % Formol-NaCl	++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	schwach spontan- agglutiniabel
Antiserum nach SMITH u. METZGER															
Antigen nach	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	Negativkontrolle	
SEELIGER	+	+	++	++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
SMITH u. METZGER	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+	+	+	+	+	(+)	-	-
OSEBOLD	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++	+	+	-	-	-
0, 3 % Formol-NaCl	(+)	+	++	++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	(+)	+	schwach spontan- agglutiniabel

Serumverdünnungen ab 1:500 abgerundet

Antiserum nach SEELIGER

Antigen nach	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	Negativkontrolle
SEELIGER	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-
SMITH u. METZGER	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-
OSEBOLD	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)	-	-	-
0,3 % Formol-NaCl	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+	(+)	-	-	sehr schwach spont. agglutiniabel

Antiserum nach SMITH u. METZGER

Antigen nach	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	Negativkontrolle
SEELIGER	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	(+)	-	-	-
SMITH u. METZGER	(+)	+	++	++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
OSEBOLD	+++	++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	(+)	-	-	-
0,3 % Formol-NaCl	++	++	++	+++	+++	++++	+++	+++	++	+	(+)	-	-	sehr schwach spont. agglutiniabel

Serumverdünnungen ab 1:500 abgerundet

Tabelle 7 L. monocytogenes Stamm Nr. 5214

Antiserum nach SEELIGER													
Antigen nach	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
SEELIGER	+	+	+	++	++	+++	++	++	+	(+)	-	-	Negativkontrolle
SMITH u. METZGER	+	+	+	+	++	+	+	+	+	(+)	-	-	-
OSEBOLD	(+)	(+)	++	++	+++	+++	+++	++	+	(+)	-	-	-
0,3 % Formol-NaCl	+	+	++	+++	+++	++	++	+	+	(+)	-	-	schwach spontan- agglutininabel

Antiserum nach SMITH u. METZGER

Antigen nach	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000
SEELIGER	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	+	-
SMITH u. METZGER	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
OSEBOLD	+	+	++	++	++	+++	+++	++	+	++	+	(+)	-
0,3 % Formol-NaCl	+	+	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	+	schwach spontan- agglutininabel

Serumverdünnungen ab 1:500 abgerundet

Tabelle 8 L. monocytogenes Stamm Nr. 1071/53

		Antiserum nach SEELIGER													
Antigen nach		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	Negativkontrolle
SEELIGER		(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-
SMITH u. METZGER		+	+	+	+	++	++	++	++	+	(+)	-	-	-	-
OSEBOLD		(+)	(+)	+	+	++	++	++	++	++	+	(+)	-	-	-
0, 3 % Formol-NaCl		(+)	+	+	+	++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	schwach spontan - agglutininabel

Antiserum nach SMITH u. METZGER

Antigen nach		1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	Negativkontrolle
SEELIGER		-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-	-
SMITH u. METZGER		(+)	+	++	++	++	++	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-
OSEBOLD		-	(+)	+	+	+	++	++	++	++	+	(+)	-	-	-
0,3 % Formol-NaCl		+	+	+	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	schwach spontan- agglutininabel

Serumverdünnungen ab 1:500 abgerundet

IV. DISKUSSION

Auf Grund der qualitativen und quantitativen Verschiedenheiten von Kapseln und Schleim ergibt sich die Notwendigkeit einer Definition zur Abgrenzung dieser Substanzen gegenüber anderen Bestandteilen der Bakterienzelle.

DUGUID (1951), WILKINSON (1958) und SALTON (1960, 1964) weisen darauf hin, daß Kapsel- und Schleimsubstanzen außerhalb der Zellwand, "external to the rigid cell wall" (SALTON) gelegen sind. TOMCSIK (1956) hebt hervor, daß Bakterienkapseln keine Modifikation oder Schwellung der Zellwand darstellen, sondern eine positive chemische Neubildung.

Kapseln und Schleim können durch Mutation oder Fermenteinwirkung von der Zelloberfläche entfernt werden, ohne Form, Lebensfähigkeit oder Vermehrungsfähigkeit der Mikroorganismen zu beeinflussen. Sie sind also als selbständige Bestandteile einer Bakterienzelle anzusehen (SALTON 1960, 1964; WILKINSON 1958; DUBOS 1949).

Während Kapseln und Schleim im allgemeinen mittels spezieller Untersuchungsmethoden ohne besondere Schwierigkeiten lichtmikroskopisch und mittels spezifischer Immunseren auch serologisch darstellbar sind, gibt es Hüllsubstanzen, die bisher nur immunologisch nachgewiesen wurden, im übrigen aber in ihren Eigenschaften den eben genannten Substanzen entsprechen. Zu diesen Hüllsubstanzen zählen die M-Proteine der Gruppe A-Streptokokken, die Vi-Antigene der Salmonellen und die L- und B-Antigene der Colibakterien. Diagnostisch sind diese Hüllsubstanzen oder "envelope antigens" (KAUFFMANN 1954) insofern bedeutungsvoll, als sie die Rezeptoren für die O-Antigene überlagern und somit die O-Agglutination verhindern können. Derartige Strukturen sind ebenfalls verantwortlich für den STUART. FEINBERG und FEINBERG (1948) bei manchen Stämmen von Escherichia alkalescens, Proteus rettgeri und dem sog. Paracolo-

bactrum intermedium als T("thread")-Agglutination bezeichneten Agglutinationstyp.

Bei diesem Agglutinationstyp setzt sich im Gegensatz zur typischen 0-Agglutination eine weiche Masse adhaerenter Zellen am Boden des Reagenzröhrchens ab, die bei leichtem Aufschütteln spiralig aufsteigt und bei stärkerem Schütteln in feine und feinste Partikel zerfällt, so daß u.U. eine gleichmäßig trübe Zellsuspension entsteht, in der keine Agglutinate mehr erkennbar sind.

Da diese Hüllsubstanzen mit Ausnahme der Möglichkeit eines mikroskopischen Nachweises mit Kapsel- und Schleimsubstanzen viele Gemeinsamkeiten aufweisen, hat WILKINSON (1958) sie als Mikro-kapseln bezeichnet.

Nach der chemischen Zusammensetzung kann man die Kapsel- und Schleimsubstanzen in zwei Gruppen aufteilen.

Bei sehr vielen Keimen wurden polymerisierte Polysaccharide nachgewiesen, bestehend aus Disacchariden, Hexosen, Pentosen, Aminosuckern, Uron- und Glucuronsäuren, z.B. bei D. pneumoniae, der Klebsiella-Enterobacter-Gruppe, E. coli und einigen Arten der Gattung Bacillus, z.B. Bacillus circulans und Bacillus polymyxa. S. pyogenes, Gruppe A und C, kann Kapseln ausbilden, die als Hauptbestandteil Hyaluronsäure enthalten. Erwähnenswert ist der reichlich Dextran enthaltende lose Schleim, den Leukonostoc mesenteroides produziert.

Bei manchen Arten der Gattung Bacillus findet man Polypeptide. B. anthracis besitzt eine Polypeptid-Kapsel aus γ -D-Glutaminsäure, B. subtilis kann losen Schleim aus demselben Material bilden. B. megaterium besitzt, wie TOMCSIK (1956) berichtet, eine komplexe Kapsel aus Polypeptiden (γ -D-Glutaminsäure) und Polysacchariden (Aminosuckern). WILKINSON (1958) vermutet, daß es sich bei die-

sen Zuckern um Zellwandpolysaccharide handelt, die an den Teilungsstellen im Überschuß gebildet werden und sich salzähnlich mit den Kapselpeptiden verbinden. Eine ähnliche, allerdings p_H -abhängige salzähnliche Bindung zwischen Kapselpolysacchariden und Proteinen wurde von JACOX (1947) bei D. pneumoniae beschrieben und später von TOMCSIK und GUERX-HOLZER (1953) zum unspezifischen Kapselnachweis benutzt.

Kapsel- und Schleimbildung treten meist nur unter bestimmten Milieubedingungen auf. Dabei sind Menge und Viskosität dieser Substanzen sehr wechselnd. So ist durchaus denkbar, daß manche Keime extrazelluläre Substanzen bilden, die in das umgebende Nährmedium diffundieren und sich zunächst dem Nachweis entziehen.

SMITHIES und GIBBONS (1955) wiesen bei einigen halophilen Mikroorganismen einen fest an der Oberfläche haftenden Schleim aus Desoxyribonucleinsäure (DNS) nach. TAKAHASHI und GIBBONS (1957) konnten später bei Micrococcus halodenitrificans zeigen, daß diese DNS auf der Zelloberfläche eine Folge gesteigerter Permeabilität der Zellwand ist, die dann zustande kommt, wenn der Nährboden weniger als 0,7 mol NaCl enthält. In diesem Fall handelt es sich also um einen kulturell bedingten Artefakt.

In den meisten Fällen jedoch sind die extrazellulären Hüllsubstanzen als Schutzvorrichtung der Mikroorganismen gegenüber den zellulären und humoralen Abwehrreaktionen des befallenen Makroorganismus anzusehen.

Zur Abwehr zellulärer Schutzmechanismen gehört der Schutz bekapselter Mikroorganismen vor der Phagozytose.

Unbekapselte Zellen von D. pneumoniae wurden in vitro leicht von Leukozyten, die in neutralem Serum suspendiert waren, phagozytiert, während bekapselte Keime gegenüber der Phagozytose resistenter

waren und sich schnell vermehrten (ENDERS, SHAFFER und WU 1936).

Wurden Mäusen bekapselte Keime von D. pneumoniae i. p. injiziert, kam es in den nächsten Stunden zu einer raschen Vermehrung dieser Keime ohne Zeichen der Phagozytose. Injizierte man anschließend ein Ferment, das imstande ist, die Kapselpolysaccharide dieses Typs zu spalten und die Kapsel zu zerstören, erfolgte eine schnelle Phagozytose mit Heilung des Versuchstieres. Dasselbe Ferment zerstörte in vitro nur die Kapseln, beeinträchtigte jedoch nicht die Lebensfähigkeit der Keime und die Fähigkeit zur Polysaccharidbildung (AVERY und DUBOS 1931).

WILKINSON (1958) berichtet, daß unbekapselte Zellen von K. pneumoniae und E. coli schneller von Amöben phagozytiert wurden als bekapselte.

Humoral bedeutet die Anwesenheit von Hüllsubstanzen oft eine Hemmung der Bildung spezifischer Antikörper.

I. ØRSKOV (1956) wies nach, daß ein stark bekapselter Stamm von K. pneumoniae, Typ 5, mit zusätzlicher Bildung von interzellulärem Schleim derselben chemischen Zusammensetzung einen geringeren Antikörpertiter induzierte als ein schwach bekapselter Stamm desselben Typs ohne interzellulären Schleim. Sie deutet dieses Ergebnis als "immunologische Paralyse", ein Phänomen, das von FELTON und OTTINGER (1942) bei Mäusen nach Injektion großer Mengen von Kapselpolysacchariden von D. pneumoniae beschrieben worden war.

Auch SEELIGER (1954, 1958b) kam bei analogen Untersuchungen an stark bekapselten Cryptococcus-Stämmen zu derselben Folgerung.

Bei aktiver Immunisierung von Mäusen gegen den Sproßpilz C. neoformans wurde bei Anwendung einer Vaccine von stark bekapselten

Zellen ein geringerer Schutz erzielt als bei Anwendung eines Impfstoffes von schwach bekapselten Stämmen. Dabei spielte bei diesem Keim die Zahl der injizierten Zellen eine Rolle (ABRAHAMS 1960; ABRAHAMS und GILLERAN 1960; NEILL, ABRAHAMS und KAPROS 1950). Ähnlich verhielt sich die Bildung von Serumantikörpern (PARIKH 1962).

Weiterhin können Hüllsubstanzen die Keime gegen unspezifische antibakterielle Substanzen schützen.

SKARNES und WATSON (1955, 1956) wiesen nach, daß unspezifische, gegen grampositive Keime gerichtete antibakterielle Substanzen, wie Leukin und Lysozym, durch Hyaluronsäure, dem Material der Streptokokkenkapsel, gehemmt werden; weiterhin wurde die Lysozymwirkung gehemmt durch Glutamyl-Polypeptide, das Vi-Antigen und die Kapselpolysaccharide der Pneumokokken.

Ähnlich verhält es sich mit dem Schutz gegen Bakteriophagen. RAETTIG (1951) weist darauf hin, daß bei experimentellen Arbeiten mit Phagen und Keimen der Typhus-Paratyphus-Coli-Gruppe regelmäßig schleimige Formen vorkommen, und daß die Schleimbildung mit Phagenresistenz gekoppelt sei. Diese Resistenz gegenüber Phageneinwirkung wird ebenfalls von DIMITZA (1926) und KAUFFMANN (1926) bei E. coli, von KASARNOWSKY (1935) und NOVGORODSKAJA (1936) bei S. paratyphi B und von MAXTED (1952) bei S. pyogenes beobachtet. KAUFFMANN (1945) berichtet anhand von Untersuchungen zahlreicher bekapselter Stämme von E. coli, daß "je größer und stabiler die Kapseln sind, um so größer auch die hemmende Wirkung gegen Phagen ist".

Der Nachweis von Kapseln und Schleim erfordert aus zwei Gründen besondere Verfahren:

1. Da sich die Hüllsubstanzen mit den üblichen Farbstoffen sehr schlecht anfärben lassen, wendet man für ihren Nachweis im allgemeinen Reliefdarstellungen an.
2. Wegen des hohen Wassergehaltes der Kapseln von 98 % (WILKINSON 1958) kommt es beim Trocknen und Fixieren der Präparate zu einer starken Schrumpfung. Um das zu vermeiden, müssen empfindliche Kapseluntersuchungen, besonders Kapselmessungen, im wässrigen Milieu durchgeführt werden.

Die bekannteste Reliefdarstellung ist der Tuscheausstrich nach BURRI mit oder ohne anschließende Gegenfärbung der Zelle. Dabei ist jedoch zu beachten, daß es bei dieser Methode, bedingt durch die Hitzefixierung, nicht nur zu einer Schrumpfung der Kapsel, sondern auch der gesamten Zelle kommen kann. Bei anschließender Gegenfärbung wird dann nur noch die bereits geschrumpfte Zelle angefärbt und es entstehen auch bei unbekapselten Keimen Retraktionshöfe. Die Unterscheidung zwischen solchen Retraktionshöfen und echten Kapseln ist manchmal schwierig. Da die Schrumpfung stäbchenförmiger Bakterien meist in der Längsachse besonders ausgeprägt ist, ergibt sich hier eine Möglichkeit zur Erkennung solcher Erscheinungen (siehe Abb. 1, S. 44).

Auch in einem nach Gram gefärbten Ausstrich von Peritonealexsudat, Liquor cerebrospinalis oder Organausstrichen kann man manchmal Aufhellungen beobachten, die die darin enthaltenen Keime mehr oder weniger regelmäßig umgeben.

Die Schrumpfung der Kapseln kann durch Untersuchungen im wässrigen Milieu weitgehend ausgeschaltet werden. Die Hüllsubstanzen sind jedoch in wässriger Lösung unsichtbar; ihr Nachweis erfolgt anschließend durch Reliefdarstellung oder durch Sichtbarmachung der Kapseloberfläche.

Die Reliefdarstellung mit Tusche (PREISZ 1911, DUGUID 1951) darf als die empfindlichste unspezifische Kapseldarstellungsmethode angesehen werden. Hüllsubstanzen über $0,2 \mu$ Schichtdicke sowie loser Schleim sind leicht erkennbar, vorausgesetzt, die Tusche ist gleichmäßig feinkörnig und die Schichtdicke des Tuschefilms entspricht der Dicke des bekapselten Keimes. In der Fokalebene erscheint die Zellwand der Bakterien, gleichgültig ob bekapselt oder nicht, als dunkles Band, umgeben von einem hellen. Diese Bänder, die $0,2 \mu$ breit sein können, sind Brechungshöfe (sog. "diffraction halos" (DUGUID 1951)), die durch die Zelloberfläche hervorgerufen werden. Meist leuchten diese Höfe stärker als die umgebende Kapsel. So ist es wohl auch zu erklären, daß sie in der Vergangenheit zu Mißdeutungen Anlaß gegeben haben (ETINGER-TULCZYNSKA 1933, MUDD, HEINMETS und ANDERSON 1943).

Die Darstellung der Kapseloberfläche erfolgt durch die Protein-Kapsel-Reaktion (PCR) nach TOMCSIK-GUDEX-HOLZER oder durch die spezifische serologische Kapselreaktion nach NEUFELD. Diese beiden Reaktionen sind bei positivem Ausfall unter dem Mikroskop kaum zu unterscheiden, da es auch bei der PCR im günstigsten p_H -Bereich zu einer Zusammenballung der Zellen kommt, ähnlich der Agglutination durch spezifische Antikörper. TOMCSIK (1956) beobachtete allerdings bei mehreren bekapselten Keimarten, daß es sowohl bei der PCR als auch bei der spezifischen Kapselreaktion zu einer leichten Schrumpfung kommen kann. Die gleichen Beobachtungen machten EVANS, SEELIGER, KORNFELD und GARCIA (1956) an C. neoformans.

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen werden die Präparate im allgemeinen hochgradig entwässert. Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß die Kapseln von vielen Autoren zunächst nicht oder nur als sehr deformierte Gebilde dargestellt werden konnten.

BARBER (1966) berichtet anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen, daß bei B. anthracis bekapselte Keime nicht von unbekapselten unterschieden werden konnten.

ROTH, LEWIS und WILLIAMS (1960) beobachteten in Milzschnitten von milzbrandinfizierten Mäusen große, unregelmäßig begrenzte Höfe, die die Keime umgaben. Sie deuteten diese Höfe zunächst als zytopathische Zonen, die durch die Toxine der Keime zustande gekommen seien. Erst bei späteren Untersuchungen (1964) gelang der Nachweis, daß diese Zonen mit den Kapseln der Milzbranderreger identisch sind.

DUGUID und WILKINSON (1953) gelang zwar die elektronenmikroskopische Kapseldarstellung bei E. aerogenes, doch konstatieren auch sie "in most fields the bacillary outlines were obscured by dense shrunken capsular material".

MUDD, HEINMETS und ANDERSON (1943a) untersuchten die Kapseln von D. pneumoniae und beschreiben mit den Worten PASTEUR's, daß diese Kapseln die Keime als "une sorte d'auréole" umgaben. Bei Betrachtung der von den Autoren erbrachten Mikrophotographien ist allerdings kein eindeutiger Unterschied zwischen bekapselten und unbekapselten Keimen zu erkennen. Bessere Ergebnisse wurden nach Zugabe von homologem Antiserum oder gereinigtem, in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöstem Antikörper-Globulin erzielt (MUDD et al. 1943b).

BAUMANN-GRACE und TOMCSIK (1958) stellten mit dieser Technik die komplexe Kapselstruktur bei B. megaterium überzeugend dar. Während bei Anwendung spezifischer Antiseren die elektronenmikroskopischen Ergebnisse mit den Beobachtungen im Phasenkontrastmikroskop übereinstimmten, blieb die Kapsel nach Zugabe von neutralem Serum unsichtbar. Die Autoren vermuten, daß die Kapsel durch die Antigen-Antikörperreaktion in ihr stabilisiert wird.

SMITH und METZGER (1962) benutzten ebenfalls spezifische Antiseren bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Frage einer Kapselbildung bei L. monocytogenes. Um eine vollständige Entwässerung zu vermeiden, benutzten sie zur Fixierung ihrer Präparationen 10 %-ige phosphatgepufferte Formalinlösung (p_H 7,2). Die Weiterbehandlung der fixierten Präparate erfolgte nach drei verschiedenen Methoden:

- a. durch 15-minütige Bedampfung mit Osmium-Tetroxyd-Dampf;
- b. durch Zugabe von spezifischem, mit Ferritin markiertem Antiserum und anschließender Kontrastierung mit Uran;
- c. durch Zugabe von unmarkiertem spezifischem Antiserum bei gleichzeitiger Kontrollpräparation mit neutralem Kaninchenserum und anschließender Kontrastierung mit Uran.

Die amerikanischen Autoren stellten mit diesen Verfahren bei L. monocytogenes eine als Kapsel deutbare Struktur dar und belegten dies durch Mikrophotographien:

1. Nach Behandlung der Keime mit Osmium-Tetroxyd-Dampf stellte sich die Oberfläche dieser Kapsel als dunkle Grenzlinie dar (Abbildung 1 der zitierten Veröffentlichung).
2. Nach Behandlung mit markiertem Antiserum wurde die Kapsel durch die Ablagerung der mit Ferritin beladenen Antikörper sichtbar. Die Oberfläche dieser Struktur ist weitgehend regelmäßig. Das in der weiteren Umgebung der Zelle abgelagerte Ferritin ist nach Ansicht der Autoren durch elektrostatische Ladung des Netzes und durch Reaktion der markierten Antikörper mit abgetrennten Teilen der Kapsel zu erklären (Abb. 2).
3. Nach Zugabe von spezifischem unmarkiertem Antiserum sind die Zellen von einem dunklen, teilweise unscharf begrenzten Hof umgeben. Die Kontrollpräparation mit neutralem Kaninchenserum läßt nur einen unregelmäßigen zarten Saum erkennen.

Mittels verschiedener histochemischer Reaktionen wurde die chemische Zusammensetzung dieser Kapselstruktur untersucht. Auf Grund dieser Untersuchungen soll sie aus Mucopolysacchariden und sauren Mucopolysacchariden bestehen.

Die Feinstruktur der Listeria-Zelle wurde später von EDWARDS und STEVENS (1963) und GRUND (1963, 1964) elektronenmikroskopisch analysiert. Für diese Untersuchungen wurden von den Autoren Zellschnitte hergestellt, die nach der üblichen Methodik fixiert, entwässert und eingebettet wurden.

EDWARDS und STEVENS richteten bei ihren Untersuchungen ihre besondere Aufmerksamkeit auf extrazelluläre Strukturen, konnten aber keine Kapseln feststellen - "capsules were not present in our preparations". Bei einigen Mikrophotographien dieser Veröffentlichung sind unregelmäßige Auflagerungen der Zellwand zu erkennen, die von den Autoren auf Grund vergleichender Kapseluntersuchungen bei D. pneumoniae als zellfremdes, an die Zelloberfläche adsorbiertes Material erklärt werden.

GRUND beobachtete ebensowenig eine typische Kapselstruktur. Er berichtet aber über dieselben unregelmäßigen Partikel an der Zelloberfläche, die allerdings nur bei Zellen von festen Nährböden vorhanden waren; wurden die Keime in Bouillon gezüchtet, waren keine Auflagerungen erkennbar.

SMITH und METZGER untersuchten ihre Listeria-Stämme nach Wachstum auf festen Nährböden. Dabei ist die Möglichkeit, daß Nährbodenreste an der Zelloberfläche zurückblieben, nicht auszuschließen. Da die Autoren aber zur Züchtung einen Nährboden mit einem hohen Serumgehalt gebrauchten, ist immerhin denkbar, daß an der Zelloberfläche haftende Serumreste durch die zur Fixierung verwendete 10 %ige

Formalinlösung präzipitiert wurden und eine Kapselstruktur vor-tauschten (Abb. 1 der zitierten Arbeit).

Bei Anwendung eines spezifischen Antiserums waren die Keime von einem unscharf begrenzten Hof geringer Dichte umgeben. Bei drei parallel nebeneinander liegenden Zellen in Abb. 4 dieser Arbeit entsprechen die Zwischenräume zwischen den Zellen nur etwa einem Viertel des Durchmessers der Höfe. Vorausgesetzt, die abgebildeten Keime liegen in einer Ebene, sollte man erwarten, daß die Zellen von den Kapseln als gleichmäßige Schicht umgeben werden; bei Lichtmikroskopischen Untersuchungen ist das jedenfalls immer festzustellen. Darüberhinaus sollte man erwarten, daß die Kapseloberfläche parallel zur Zelloberfläche läuft. Die unscharfen Höfe konfluieren aber und lassen keineswegs einen gleichmäßigen parallelen Verlauf der Grenzlinie erkennen.

So erhebt sich die Frage, ob nicht vielleicht in diesem Falle die als Kapsel gedeutete Struktur durch eine diffuse Anlagerung von Antikörpern bedingt ist. Ebenso könnte der zarte Saum, der die Zellen in den Kontrollpräparaten mit neutralem Kaninchenserum (Abb. 3) umgibt, mit einer Retraktion des Plasmas von der Zellwand erklärt werden.

Ein gleichmäßiger, kapselähnlicher Hof wurde nach Anwendung von markiertem spezifischen Antiserum sichtbar (Abb. 2). Leider ist auf dieser Photographie nur eine einzige Zelle abgebildet und ein Vergleich dieser Struktur mit denen anderer Keime nicht möglich.

Auffallenderweise fehlt bei den von SMITH und METZGER angefertigten ultradünnen Zellschnitten jeder Hinweis auf das Vorhandensein einer Kapsel.

Obwohl L. monocytogenes in den vergangenen Jahren in allen Teilen der Welt isoliert und vielfach untersucht wurde, sind SMITH und

METZGER die einzigen geblieben, die eine Kapsel bei diesem Keim beschrieben haben. Der Nachweis gelang nur elektronenmikroskopisch. Nun sind Kapseln gerade für elektronenmikroskopische Untersuchungen schlecht geeignete Objekte, und die Verwechslung mit Kunstprodukten ist leicht möglich.

Die Untersuchungen an bekapselten Stämmen von D. pneumoniae (MUDD et al. 1943 a, 1943b), E. aerogenes (DUGUID und WILKINSON 1953) und besonders B. megaterium (BAUMANN-GRACE und TOMCSIK 1958) haben gezeigt, daß die elektronenmikroskopischen Untersuchungsmethoden zur Kapseldarstellung den lichtmikroskopischen im allgemeinen nicht überlegen, wegen der starken Schrumpfung und Artefaktbildung u. U. unterlegen sind. Aus diesem Grunde ist in der vorliegenden Arbeit der Versuch einer Kapseldarstellung bei L. monocytogenes nur lichtmikroskopisch geführt worden.

Eine Kapselbildung ist im allgemeinen schon makroskopisch durch schleimiges Wachstum zu erkennen. Da ein solches Wachstum normalerweise bei Listeria-Kulturen fehlt, züchteten SMITH und METZGER ihre Stämme über mehrere Passagen auf SGTS-Agar und berichten über die Veränderungen auf diesem Nährboden: "When the various strains were passed on SGTSA, there was a more pronounced growth and the colony characteristics differed from those normally observed. The colonies were circular, convex, smooth surfaced, and grayish-white. They varied in size from 1 to 3 mm after 24 hours' incubation at 37°C. They were of mucoid consistency".

Diese Beobachtungen ließen sich in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigen. Im Vergleich zu den parallel angelegten Blutagar-Ausstrichkulturen war auf SGTS-Agar keineswegs ein kräftigeres oder schleimiges Wachstum festzustellen, im Gegenteil, bei den Stämmen Nr. 5105 und Nr. 1071/53 wurden auf Blutagar konstant größere

Kolonien erzielt als auf SGTS-Agar. Die Konsistenz der sehr zarten Kolonien auf SGTS-Agar ist zwar als weich zu bezeichnen, keineswegs aber schleimig-fadenziehend. Dabei dürfte wohl die weiche Konsistenz der Kolonien in erster Linie auf den relativ hohen Flüssigkeitsgehalt des Nährbodens zurückzuführen sein.

Auch die nach jeder Passage auf SGTS-Agar durchgeführten Untersuchungen mittels verschiedener Kapselnachweismethoden ergaben nie einen Hinweis auf eine Kapselbildung bei L. monocytogenes.

Sowohl für die Untersuchungen von SMITH und METZGER als auch für die eigenen wurden Typstämme von L. monocytogenes verwandt. Die Stämme der amerikanischen Autoren, Nr. 4428, Nr. 5348, Nr. 5105, Nr. 5214 und Nr. 1071/53 standen für Vergleiche zur Verfügung. Dabei zeigte sich aber, daß sich der Stamm Nr. 4428, der von SMITH und METZGER als Serotyp 1 angegeben war, im hiesigen Labor bei dreimaliger Überprüfung im Verlauf von 4 Jahren als Serotyp 3 erwies (Agglutination in den O-Faktorenseren I, II; IV und in den H-Faktorenseren A; AB). Die übrigen Stämme stimmen serologisch mit den eigenen überein, anstelle Nr. 4428 wurde Nr. 7973 verwandt.

Laborstämme verlieren im Laufe von Jahren häufig bestimmte genetische Merkmale. METZGER und SMITH (1962) beschrieben den Verlust von Antigenfaktoren bei Laborstämmen von L. monocytogenes. Besonders häufig sind Abschwächung oder Verlust der Virulenz Folgen der Züchtung auf einfachen Nährböden. So war bei den eigenen Untersuchungen die Virulenz gegenüber der weißen Maus bei Stamm Nr. 5214 abgeschwächt und fehlte bei Stamm Nr. 5105. Da aber Kapsel- und Schleimbildung bedingt als "Virulenzfaktoren" anzusehen sind, ist es erstaunlich, daß den amerikanischen Autoren der Nachweis einer Kapsel gerade bei Laborstämmen geglückt ist, während bei frisch isolierten Stämmen von natürlichen Infektionen

bisher weder eine Kapsel noch ausgesprochen schleimiges Wachstum beschrieben wurde.

Die Typstämme Nr. 7973 (Serotyp 1) und Nr. 1071/53 (Serotyp 4b) erwiesen sich im Tierversuch als vollvirulent gegenüber der weißen Maus. Aber auch nach mehreren Tierpassagen änderte sich das Aussehen der Kolonien nicht. In hitzefixierten und nach Gram gefärbten Ausstrichen von Leber- und Peritonealexsudat sowie im Tuscheausstrich (BURRI) und im Eosinausstrich (HOWIE-KIRKPATRICK) waren gelegentlich schmale, unterschiedlich große Höfe zu erkennen. Diese Höfe sind als Retraktionshöfe, bedingt durch die bei der Hitze-fixierung entstehende Schrumpfung, aber nicht als schmale Kapsel anzusehen. In den gleichzeitig angefertigten feuchten Präparationen (PREISZ-DUGUID, NEUFELD) ließen sich auch im Peritonealexsudat keine Kapseln darstellen. Abb. 1 (s.S. 44) zeigt solche Retraktionshöfe im Tuscheausstrich nach BURRI. Abb. 2 (s.S. 44) zeigt einen nach Gram gefärbten Liquorausstrich von einer Listeria-Meningitis mit ähnlichen angedeuteten Höfen, die im Originaldiapositiv noch deutlicher sichtbar sind. In feuchten Präparaten sind Listerien meist von einer stark lichtbrechenden Schicht umgeben, besonders wenn sie an der Unterfläche des Deckglases haften. Diese stark lichtbrechende Zone an der Zelloberfläche entspricht den von DUGUID (1951) beschriebenen "diffraction halos" und ist nicht als schmale Kapsel anzusehen.

OSEBOLD, AALUND und CHRISP (1965) stellten bei frisch isolierten Stämmen von natürlichen Nagerinfektionen eine Abschwächung der 0-Agglutination fest. Während bei Anwendung formalininaktivierter Antigene dieser Stämme die 0-Agglutination nur wenig beeinträchtigt war, war nach 15 min. Autoklavieren der Aufschwemmungen bei 120° C die Hemmung stark ausgeprägt. Nach anschließender Behandlung mit Trypsin nahm die Agglutinationsstärke proportional der

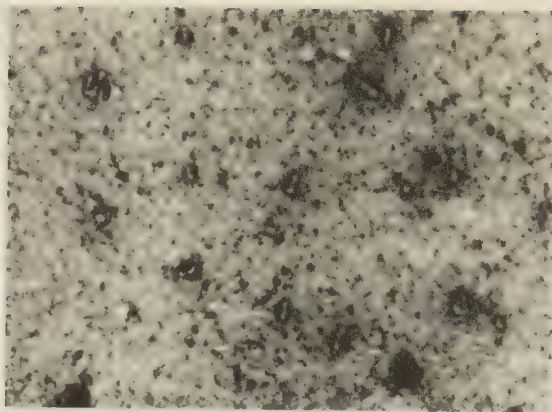


Abb. 1

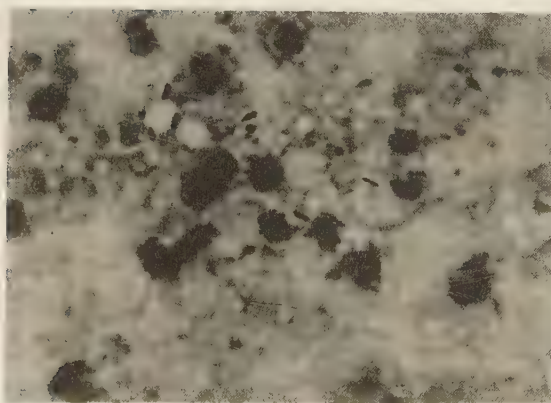


Abb. 2

Einwirkungsdauer des Trypsins bis zu einem gewissen Punkt zu. Die Autoren vermuten, daß an der Zelloberfläche gelegene Proteine oder Polypeptide, die beim Autoklavieren durch Denaturierung stark quellen, die O-Rezeptoren weitgehend überlagern können. Diese Befunde konnten im Prinzip in den eigenen Untersuchungen auch bei Laborstämmen von L. monocytogenes bestätigt werden. In Agglutinationsversuchen mit verschiedenen bereiteten O-Antigenen ergaben sich zwar keine wesentlich voneinander abweichenden Serumtiter, wohl aber gewisse Unterschiede in der Agglutinationsstärke. Während die Antigensuspensionen, die durch Erhitzen auf 100°C inaktiviert worden waren (O-Antigene nach SEELIGER und SMITH/METZGER), im allgemeinen eine feinkörnige und härtere Agglutination bewirkten, ergaben die nach OSEBOLD und Mitarbeitern bereiteten trypsinisierten Antigensuspensionen in den meisten Seren etwas größere, grobfetzigere Agglutinate. Ein Vorteil dieser Antigensuspensionen liegt darin, daß der Übergang von einer deutlich positiven Reaktion zur negativen meist nur über 1 bis 2 Verdünnungsstufen lief und somit der Grenztiter leichter ermittelt werden konnte. Dieser Vorteil könnte vielleicht in der serologischen Diagnostik der Listeriose genutzt werden, da hier die Ermittlung der Grenzwerte nicht selten Schwierigkeiten bereitet.

Proteine im Bereich der Zelloberfläche sind bei grampositiven Bakterien kein seltener Befund. Sie wurden z. B. bei S. pyogenes (BARKULIS und JONES 1957), Corynebacterium diphtheriae (CUMMINS 1954) und Staphylococcus aureus (OEDING 1960) dargestellt. In diesen Fällen ließ sich die Antigenwirksamkeit der Oberflächenproteine nachweisen.

Ob die von OSEBOLD und Mitarbeitern beschriebenen Oberflächenproteine nun Bestandteil der Zellwand sind, die lediglich peripherer liegen als die funktionellen Gruppen der Polysaccharidantigene und

dadurch diese Rezeptoren überlagern, oder ob es sich bei diesen Proteinen um eine selbständige, von der Zellwand unabhängige Schicht, "an independent layer" (SALTON 1960) im Sinne einer Mikrokapsel (WILKINSON 1958) handelt, müßte in künftigen Untersuchungen noch geklärt werden. Die serologische Aktivität dieser Substanzen wurde bisher nicht untersucht, und Protein-Antigene der Zellwand sind bisher bei L. monocytogenes nicht nachgewiesen worden (OSEBOLD et al. 1965).

In den eigenen Agglutinationsversuchen mit verschiedenen bereiteten O-Antigenen ließ sich bei allen Stämmen ein eindeutiger O-Agglutinationstyp erkennen. Der von STUART und Mitarbeitern beschriebene und durch Mikrokapseln (WILKINSON) hervorgerufene T-Agglutinationstyp konnte auch bei der Agglutination von formalininaktivierten Vollantigenen nicht gefunden werden.

SMITH und METZGER weisen in ihrer Arbeit darauf hin, daß im Elektronenmikroskop keine Unterschiede in der Kapselreaktion bei Anwendung von "Kapselseren" oder normalen Antiseren festzustellen waren. Da die beschriebenen Kapselstrukturen aus Mucopolysacchariden bzw. sauren Mucopolysacchariden bestehen sollen, ist nicht unbedingt zu erwarten, daß diese Substanzen durch Erhitzen auf 100°C denaturiert werden. Es wäre also denkbar, daß, wenn solche Substanzen wirklich gebildet werden, diese auch als besondere Antigenfaktoren nachweisbar sind. Das setzt natürlich voraus, daß diese Kapsel-Mucopolysaccharide nicht nur auf einer Vermehrung von Zellwand-Polysacchariden derselben chemischen Zusammensetzung beruhen, wie WILKINSON (1958) es z.B. bei der komplexen Kapsel von B. megaterium vermutet, sondern um eine echte Neubildung eines chemisch anderen Materials.

Deshalb war zu untersuchen, ob die mittels "capsule enhanced antigen" nach SMITH und METZGER gewonnenen Antiseren besondere Faktoren enthielten, die bei "normalen" O-Antigenen fehlen.

Zu diesem Zweck wurde je eine Serumprobe dieser "Kapselseren" mit dem typgleichen O-Antigen nach SEELIGER (1955, 1961) und OSEBOLD (1965) abgesättigt. Die so von jedem Stamm erhaltenen zwei "Faktorensereen" ergaben aber unter dem Mikroskop weder eine Agglutination noch eine Kapselreaktion.

Demnach scheint keine Unterschied zwischen gebräuchlichen O-Antiseren und "Kapselantiseren" zu bestehen. "Kapselfaktoren" waren nicht nachweisbar.

Zusammenfassend kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse und Literaturhinweise gefolgert werden, daß es keine überzeugenden Beweise für das Vorhandensein einer Kapsel bei L. monocytogenes gibt und daß eine solche Kapsel mit den gebräuchlichen kulturellen Anreicherungsverfahren und durch Tierpassagen nicht induziert werden kann.

Ob die im Bereich der Zelloberfläche anzutreffenden Polypeptide oder Proteine integrale Bestandteile der Zellwand sind oder extrazelluläre Hüllsubstanzen im Sinne einer Mikrokapsel (WILKINSON 1958), müßte in künftigen Untersuchungen geklärt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Nachdem SMITH und METZGER (1962) mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungsmethoden eine als Kapsel deutbare Struktur bei Typstämmen von L. monocytogenes beschrieben haben, die aus Mucopolysacchariden und sauren Mucopolysacchariden bestehen soll, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob diese Befunde auch durch lichtmikroskopische oder serologische Methoden bestätigt werden konnten.

Unter Verwendung des von den genannten Autoren zur Kapselanreicherung angegebenen SGTS-Agar wurde aber selbst nach 20 Passagen kein kräftigeres oder schleimigeres Wachstum erzielt als auf den parallel angelegten Blutagarkulturen. Nach Anwendung von lichtmikroskopischen Kapselnachweismethoden, deren Empfindlichkeit und Spezifität vorher bei verschiedenen bekapselten Keimen gesichert wurde, ergab sich nach Züchtung auf SGTS-Agar kein Hinweis auf das Vorhandensein einer Kapsel.

Gleichsinnige negative Befunde wurden nach fünfmaliger Tierpassage der Stämme Nr. 7973 und Nr. 1071/53 erhalten.

Nach Absättigung der nach SMITH und METZGER hergestellten "Kapselantisera" mit typgleichen O-Antigenen nach SEELIGER (1955, 1961) und OSEBOLD et al. (1965) waren keine Kapsel-Antikörperfaktoren nachweisbar.

Agglutinationsversuche mit verschiedenen bereiteten O-Antigenen in homologen Antiseren ergaben keine wesentlich voneinander abweichenden Serumtiter. Stets trat eine typische, körnige O-Agglutination auf. Der von STUART und Mitarbeitern (1948) beschriebene und durch Mikrokapseln (WILKINSON 1958) hervorgerufene

T-Agglutinationstyp war auch bei Anwendung von Antigensuspensionen, die mit 0,3 %-iger Formol-NaCl-Lösung abgetötet worden waren, nicht feststellbar. Eine gewisse Zunahme der Agglutinationsstärke nach Anwendung von trypsinisierten O-Antigenen kann als Bestätigung der Befunde von OSEBOLD und Mitarbeitern (1965) angesehen werden, wonach L. monocytogenes eine dünne Schicht von Polypeptiden oder Proteinen besitzt, die nach Denaturierung durch Erhitzen quellen und die O-Rezeptoren überlagern kann.

Die vorliegende Literatur wird im Zusammenhang mit den eigenen Befunden diskutiert.

Daraus wird die Folgerung gezogen, daß es keine überzeugenden Beweise für das Vorhandensein einer Bakterienkapsel bei L. monocytogenes gibt und daß sich eine solche Kapsel auch nicht mit einfachen Mitteln induzieren läßt.

Ob die im Bereich der Zelloberfläche anzutreffenden Polypeptide bzw. Proteine integrale Bestandteile der Zellwand sind oder extrazelluläre Hüllsubstanzen, müßte noch geklärt werden.



Herrn Professor Dr. Seeliger danke ich aufrichtig für die Überlassung des Themas und die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der Versuche und der Abfassung der Arbeit.



VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABRAHAM, I.: Active protection against experimental Cryptococcosis.
Bact. Proc. 137 (1960)
2. ABRAHAM, I. and T.G.GILLERAN: Studies on actively acquired resistance to experimental Cryptococcosis in mice.
J. Immunol. 85, 629 (1960)
3. AVERY, O.T. and R.J.DUBOS: The protective action of a specific enzyme against type III Pneumococcus infection in mice.
J. Exp. Med. 54, 73 (1931)
4. BARBER, C.: Critique des expériences tendant à mettre en évidence une "capsule" chez Bacillus anthracis.
Ann. Inst. Pasteur 111, 226 (1966)
5. BARKULIS, S.S. and M.F.JONES: Studies on streptococcal cell walls. I. Isolation, chemical composition, and preparation of M protein.
J. Bact. 74, 207 (1957)
6. BAUMANN-GRACE, J.B. and J. TOMCSIK: Elektronenmikroskopische Untersuchung der komplexen Kapselstruktur bei Bacillus megaterium.
Schweiz. Z. Path. Bakt. 21, 906 (1958)
7. BURRI, R.: Das Tuscheverfahren als einfaches Mittel zur Lösung einiger schwieriger Aufgaben der Bakterioskopie.
Fischer, Jena 1909
8. CUMMINS, C.S.: Some observations on the nature of the antigens in the cell wall of Corynebacterium diphtheriae.
Brit.J.Exp.Path. 35, 166 (1954)
9. DIMTZA, A.: Über Veränderungen von Colistämmen durch Bakteriophagenwirkung "in vivo und in vitro".
Zbl.Bakt., I. Abt. Orig. 101, 171 (1926)
10. DONKER-VOET, J.: Serological studies on some strains of Listeria monocytogenes.
T. Diergeneesk. 82, 341 (1957)

11. DUBOS, R.J.: The Bacterial Cell.
Harvard Univ. Press, Cambridge 1949
12. DUGUID, J.P.: The demonstration of bacterial capsules
and slime.
J. Path. Bact. 63, 673 (1951)
13. DUGUID, J.P. and
J.F. WILKINSON: The influence of cultural conditions on
polysaccharide production by *Aerobacter*
aerogenes.
J. Gen. Microbiol. 9, 174 (1953)
14. EDWARDS, M.R. and
R.W. STEVENS: Fine structure of *Listeria monocyto-*
genes.
J. Bact. 86, 414 (1963)
15. ENDERS, J.F.,
M.F. SHAFFER and
C.J. WU: Correlation of the behaviour in vivo of
Pneumococci type III varying in their
virulence for rabbits with certain
differences observed in vitro.
J. Exp. Med. 64, 307 (1936)
16. ETINGER -
TULCZYNSKA, R.: Bakterienkapseln und "Quellungsreaktion"
Z. Hyg. Infekt. Kr. 114, 769 (1933)
17. EVANS, E.E.,
H.P.R. SEELIGER,
L. KORNFELD and
C. GARCIA: Failure to demonstrate capsular
swelling in *Cryptococcus neoformans*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 93, 257 (1956)
18. FELTON, L.D. and
B. OTTINGER: *Pneumococcus* polysaccharide as a
paralyzing agent on the mechanism
of immunity in white mice. (Abstract)
J. Bact. 43, 94 (1942)
19. FELDSTEIN, R.G.: Veränderlichkeit des *Bacterium dys-*
enteriae Shiga unter dem Einfluß der
Bakteriophagen und von Immunsereen.
I. und II. Mitteilung
Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. 141, 79, 80 (1942)
20. GRUND, S.: Komplexe intracytoplasmatische Membra-
nen bei *Listeria monocytogenes*.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 189, 405 (1963)
21. GRUND, S.: Vergleich der Zellgrenzen, Mesosomen
und anderer Feinstrukturen von *Listeria*
monocytogenes Paterson Stamm 2 nach
Vermehrung in vivo und in vitro.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 194, 462 (1964)

22. D'HERELLE, F.: Der Bakteriophage.
Vieweg und Sohn, Braunschweig 1922
23. HOWIE, J.W. and J.KIRKPATRICK: Observations on bacterial capsules as demonstrated by a simple method.
J. Path. Bact. 39, 165 (1934)
24. JACOX, R.F.: A new method for the production of non specific capsular swelling of the Pneumococcus.
Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 66, 635 (1947)
25. KASARNOWSKY, S.E., E.NOVGORODSKAJA und H.HEINZE: Zur Frage der epidemiologischen Bedeutung der schleimbildenden Abarten des Bacterium paratyphi B Schottmüller.
Zbl.Bakt., I.Abt. Ref. 118, 162 (1935)
26. KAUFFMANN, F.: Keimumwandlung und Lysinwirkung.
Z. Hyg. 106, 520 (1926)
27. KAUFFMANN, F. und G.VAHLNE: Über die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagenwirkung in der Coli-Gruppe.
Acta Path. Microbiol. Scand. 22, 119 (1945)
28. KAUFFMANN, F.: Enterobacteriaceae.
Munksgaard, Copenhagen 1954
29. KIMURA, S.: Über Schleimbildung bei Bakterien unter dem Einflusse von Bakteriophagen.
Z. Immun-Forschg. 42, 507 (1925)
30. MAXTED, W.R.: Enhancement of streptococcal bacteriophage lysis by Hyaluronidase.
Nature 170, 1020 (1952)
31. MAXTED, W.R.: Observations on streptococcal bacteriophage.
J. Gen. Microbiol. 8, ii (1953)
32. MAXTED, W.R.: The influence of bacteriophage on Streptococcus pyogenes.
J. Gen. Microbiol. 12, 484 (1955)
33. METZGER, J.F. and C.W.SMITH: Serologic typing of Listeria monocytogenes by gel diffusion using thermostable antigen.
Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 110, 903 (1962)

34. MUDD, S.,
F. HEINMETS and
T. F. ANDERSON: Bacterial morphology as shown by the electron microscope.
VI. Capsule, cell wall, and inner protoplasm of *Pneumococcus*, type III.
J. Bact. 46, 205 (1943) (a)
35. MUDD, S.,
F. HEINMETS and
T. F. ANDERSON: The pneumococcal capsular swelling reaction studied with the aid of the electron microscope.
J. Exp. Med. 78, 327 (1943) (b)
36. NEILL, J. M.,
I. ABRAHAMS and
C. E. KAPROS: A comparison of the immunogenicity of weakly encapsulated and of strongly encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans* (*Torula histolytica*).
J. Bact. 59, 263 (1950)
37. NEUFELD, F.: Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorien der Agglutination.
Z. Hyg. Infekt. Kr. 40, 54 (1902)
38. NOVGORODSKAJA, E. M.: Zur Biologie der schleimbildenden Varianten des *Bacterium paratyphi B* schottmülleri.
Zbl. Ges. Hyg. 37, 153 (1936)
39. OEDING, P.: Antigenic properties of *Staphylococcus aureus*.
Bacteriol. Rev. 24, 374 (1960)
40. ORSKOV, I.: "Immunological paralysis" induced in rabbits by a heavily capsulated *Klebsiella* strain.
Acta Path. Microbiol. Scand. 38, 375 (1956)
41. OSEBOLD, J. W.,
O. AALUND and
C. E. CHRISP: Chemical and immunological composition of surface structures of *Listeria monocytogenes*.
J. Bact. 89, 84 (1965)
42. PARIKH, R.: Über den Wert verschiedener Immunisierungs-Methoden zur Gewinnung von Antiseren gegen stark und schwach bekapselte *Cryptococcus*-Stämme.
Inaugural-Dissertation, Bonn 1962

43. PATERSON, J.S.: The antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*.
J. Path. Bact. 51, 427 (1940)
44. PREISZ, H.: Studien über das Variieren und das Wesen der Abschwächung des Milzbrandbazillus.
Zbl.Bakt., I.Abt. Orig. 58, 510 (1911)
45. RAETTIG, H.: Die Schleimbildung in der Typhus-Paratyphus-Coli-Gruppe als Mutationsphänomen.
Zbl.Bakt., I.Abt. Orig. 157, 62 (1951)
46. ROTH, I.L., C.W.LEWIS jr., and R.P.WILLIAMS: Electron microscope study of *Bacillus anthracis* in mouse spleen.
J. Bact. 80, 772 (1960)
47. ROTH, I.L. and R.P.WILLIAMS: Nature of the cytopathic area surrounding virulent cells of *Bacillus anthracis* in mouse spleen.
J. Bact. 88, 523 (1964)
48. SALTON, M.R.J.: Surface layers of the bacterial cell in: *The Bacteria*, Vol. I
Hrsg.: GUNSALUS and STANIER
Acad. Press, New York and London 1960
49. SALTON, M.R.J.: The bacterial cell wall.
Elsevier Publ. Co., Amsterdam, London, New York 1964
50. SEELIGER, H.P.R.: Experimentelle Untersuchungen zur mykologischen Serodiagnostik.
Habilitationsschrift, Bonn 1954
51. SEELIGER, H.P.R.: Listeriose.
Joh. Ambrosius Barth, 1. Auflage
Leipzig 1955
52. SEELIGER, H.P.R.: Listeriose.
Joh. Ambrosius Barth, 2. Auflage
Leipzig 1958 (a)
53. SEELIGER, H.P.R.: Mykologische Serodiagnostik
Joh. Ambrosius Barth, Leipzig 1958 (b)

54. SEELIGER, H.P.R.: Listeriosis
Karger, Basel, New York 1961

55. SEELIGER, H.P.R. und Krankheitszustände durch Sproß- und
H.WERNER: Schimmelpilze.
in: Handbuch der experimentellen
Pharmakologie, Band XVI
Hrsg.: O.EICHLER
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York 1967

56. SKARNES, R.C. and The inhibition of lysozyme by acidic
D.W.WATSON: polymers from pathogenic bacteria.
J. Bact. 70, 110 (1955)

57. SKARNES, R.C. and Characterisation of leukin: an anti-
D.W.WATSON: bacterial factor from leucocytes active
against grampositive pathogenes.
J. Exp. Med. 104, 829 (1956)

58. SMITH, C.W. and Demonstration of a capsular structure
J.F.METZGER: on *Listeria monocytogenes*.
Path. Microbiol. 25, 499 (1962)

59. SMITHIES, W.R. and The desoxyribose nucleic acid slime
N.E.GIBBONS: layer of some halophilic bacteria.
Canad. J. Microbiol. 1, 614 (1955)

60. SONNENSCHN, C.: Atypische Wuchsformen von Bakterien
als Krankheitserreger. Mucosus-Form
von *Bacterium paratyphi* im Blut eines
Paratyphuskranken.
Zbl.Bakt., I.Abt. Orig. 100, 11 (1926)

61. SONNENSCHN, C.: Für Demonstrationszwecke geeignetes
Bakterien-Phag-System: *Bacterium coli*
mutabile und darauf wirksamer Bakterio-
phage.
Zbl.Bakt., I.Abt. Orig. 126, 433 (1932)

62. STUART, C.A., An unusual type of O-agglutination.
R.FEINBERG and J. Bact. 56, 419 (1948)
R.FEINBERG

63. TAKAHASHI, I. and Effect of salt concentration on the extra-
N.E.GIBBONS: cellular nucleic acids of *Micrococcus*
halodenitrificans.
Canad. J. Microbiol. 3, 687 (1957)

64. THOMASSEN, K.: Investigations on the mucoid variety of *Salmonella schottmülleri*.
Zbl.Bakt., I. Abt. Ref. 140, 62 (1941)
65. TOENNIESSEN, E.: Untersuchungen über die Kapsel der pathogenen Bakterien. I. Die in Kulturen und im Tierkörper gebildete Kapsel: Darstellungsmethode.
Zbl.Bakt. I. Abt. Orig. 65, 23 (1912)
66. TOENNIESSEN, E.: Über die Agglutination der Kapselbacillen. Untersuchungen über die Bedeutung der einzelnen Bestandteile der Bakterienzelle für die Agglutininherzeugung und für den Vorgang der Agglutination.
Zbl.Bakt., I. Abt. Orig. 75, 329 (1914)
67. TOENNIESSEN, E.: Über die chemische Beschaffenheit der Bakterienhüllen und über die Gewinnung der Eiweißsubstanz aus dem Inneren der Bakterienzelle.
Münch.med. Wschr. 66, 1412 (1919)
68. TOENNIESSEN, E.: Untersuchungen über die Kapsel (Gummihülle) der pathogenen Bakterien. II. Die chemische Beschaffenheit der Kapsel und ihr dadurch bedingtes Verhalten gegenüber der Fixierung und Färbung.
Zbl.Bakt., I. Abt. Orig. 85, 225 (1920)
69. TOMCSIK, J. und S.GUEX-HOLZER: Ein neues Prinzip zur Färbung der Bakterienkapsel.
Schweiz. Z. Path. Bakt. 16, 882 (1953)
70. TOMCSIK, J.: Bacterial capsules and their relation to the cell wall.
in: Bacterial Anatomy.
Sixth Symposium of the Soc. Gen. Microbiol. Univ. Press, Cambridge 1956
71. WHEELER, W.E., A.L.LUHBY and M.L.L.SCHOLL: The action of enzymes in hemagglutinating systems. II. Agglutinating properties of trypsin-modified red cells with anti Rh sera.
J. Immunol. 65, 39 (1950)

72. WILKINSON, J. F.:

The extracellular polysaccharides of bacteria.

Bacteriol. Rev. 22, 46 (1958)

73. YASUDA, S.:

Studien über schleimbildende Bakterien.
II. Mitteilung. Untersuchungen über eine
zu dem *Micrococcus catharrhalis* ge-
hörende schleimige Mutante. Besonders:
Über den Einfluß der Bakteriophagen
und das Zurückschlagen aus schleimigen
Bakterien in den Normaltypus.

Zbl.Bakt., I.Abt. Ref. 112, 233 (1934)

Lebenslauf

Am 15. April 1939 wurde ich als Sohn des Oberregierungsrates Dr. rer. pol. Fritz Bockemühl und seiner Ehefrau Dr. med. Elisabeth Bockemühl, geb. Cantus, in Berlin geboren.

Ich besuchte das Städtische Gymnasium in Gummersbach von 1949 bis 1951 und anschließend das Staatliche Beethoven-Gymnasium in Bonn, wo ich am 28. Februar 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Nach Ableistung des Wehrdienstes begann ich im Sommersemester 1959 das Medizinstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich am 7. März 1960 ab, die ärztliche Vorprüfung am 16. Oktober 1961. Das medizinische Staatsexamen bestand ich am 15. März 1965. Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich an den Krankenhäusern in Bad Honnef und Siegburg sowie am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg ab.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Jochen Bockemühl

Offset-Druck Gugel, Burkarderstraße 9